

**POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA**



**URZĄD
PATENTOWY
PRL**

OPIS PATENTOWY 128529

Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 82 01 12 /P. 234695/

Pierwszeństwo: 81 01 12 Wielka Brytania

Zgłoszenie ogłoszono: 82 07 19

Opis patentowy opublikowano: 1985 09 14

CZYTELNIA

Urzędu Patentowego
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Int. Cl.³ C07G 7/00
C07D 519/04
A61K 39/395

Twórcy wynalazku: George Ferdinand Rowland, Robin George Simmonds

Uprawniony z patentu: Lilly Industries Limited, Londyn /Wielka Brytania/

SPOSÓB WYTWARZANIA PRODUKTU SPRZĘGANIA IMMUNOGLOBULINY

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania nowych produktów sprzęgania immunoglobuliny, o działaniu przeciwrakowym.

Przy zwalczaniu raka środkami chemicznymi niekiedy trzeba stosować środki lecznicze, których skuteczność jest ograniczona przez ich niepożądane działania uboczne na pacjenta, toteż stale czynione są wysiłki zmierzające do ograniczenia tych działań do minimum. Jednym z takich leków jest windezyna, to jest związek przedstawiony wzorem 1 na załączonych rysunkach. Windezynę ujawniono w brytyjskim opisie patentowym nr 1 463 575, w którym opisano jej wytwarzanie i aktywność biologiczną.

Sposobem według wynalazku wytwarza się nowe produkty sprzęgania, zawierające immunoglobulinę lub fragment immunoglobuliny, zmodyfikowane przez jedną lub większą liczbę grup o wzorze 2 związanych z nimi kowalencyjnie przez reakcję immunoglobuliny lub fragmentu immunoglobuliny z azydkiem kwasu dezacetylowinblastynowego.

Immunoglobulina lub fragment stanowią przeciwciało lub fragment przeciwciała o właściwościach rozpoznawania antygeny. Korzystny składnik immunoglobulinowy stanowi przeciwciało lub fragment przeciwciała przystosowanego do rozpoznawania antygenów na powierzchni złośliwych komórek typu występującego w organizmie ludzkim. Jednakże materiały immunoglobulinowe innych typów wchodzi również w zakres wynalazku, gdyż mogą one być użyteczne w leczeniu zwierząt i w próbach kontrolnych oraz w innych próbach.

Nowe produkty sprzęgania są stosowane do leczenia raka. Są one skuteczniejsze i dają mniejsze skutki uboczne między innymi dzięki temu, że mają zdolność zwiększania stężenia cytotoksycznego leku w miejscu działania.

Wytwarzane produkty sprzęgania mogą być wykorzystane w układach pośrednich, służyć do rozpoznawania specyficznego przeciwciała na powierzchni komórki antygeny.

Znane są immunoglobuliny właściwe dla antygenów na powierzchni komórek, które mają być zabite, jak również sposoby ich wytwarzania z surowicy szczepionych ochronnie zwierząt albo przez hodowanie guzów wydzielających produkty monokloniczne. Korzystnym typem immunoglobuliny jest IgG. Przedstawicielami immunoglobulin są:

- Ig z kóz lub owiec uodpornionych antygenem zarodkowym raka,
- Ig z króliczej surowicy przeciw ostrej białaczce limfoblastycznej,
- Ig z różnych przeciwsurowic hodowanych przeciw ostrej białaczce limfoblastycznej, ostrej białaczce szpikowej, chronicznej białaczce limfoblastycznej i chronicznej białaczce granulocytowej,
- Ig z kóz lub owiec uodpornionych materiałem raka płuc,
- monokloniczna Ig z hybrydów myszy wydzielających przeciwciała przeciw rakowi odbytnicy u ludzi,
- monokloniczna Ig z hybrydów myszy wydzielających przeciwciała przeciw czerniakowi u ludzi,
- monokloniczna Ig z hybrydów myszy wydzielających przeciwciała reagujące z komórkami białaczki u ludzi,
- monokloniczna Ig z hybrydów myszy wydzielających przeciwciała reagujące z komórkami nerwiaka niedojrzałego u ludzi,
- monokloniczna Ig z hybrydów myszy wydzielających przeciwciała reagujące z antygenami raka piersi u ludzi,
- monokloniczna Ig z hybrydów myszy wydzielających przeciwciała reagujące z komórkami raka jajnika u kobiet,
- monokloniczna Ig z hybrydów myszy wydzielających przeciwciała reagujące z komórkami mięsaka kostnego u ludzi.

Jak podano wyżej, produkty sprzęgania można też wytwarzać z fragmentów przeciwciał, oznaczonych jako Fab, Fab' lub F(ab')₂ albo z monomeru IgM wytworzonego z przeciwciała np. przez wytrawianie enzymem proteolitycznym. Substancje takie i ich wytwarzanie są znane, przy czym można nadmienić, że korzystnymi enzymami proteolitycznymi są pepsyna i papaina.

Windezynę o wzorze 1 można związać z substancją immunoglobulinową poprzez atom węgla reszty karboksylowej w pozycji 3 na drodze reakcji z odpowiednią pochodną azydkową. Według wynalazku sposób wytwarzania środka przeciw rakowi polega na reakcji immunoglobuliny lub fragmentu immunoglobuliny z azydkiem o wzorze 3. Sposób ten stanowi dogodną drogę łączenia leku, jakim jest windezyna z immunoglobuliną w łagodnych warunkach z zachowaniem integralności strukturalnej immunoglobuliny.

Proces ten prowadzi się korzystnie w środowisku wodnym, w temperaturze 5°C - 25°C, np. w temperaturze pokojowej, przy wartości pH 8,5 - 9,5, korzystnie 9,0. Wynikiem tej reakcji jest związanie za pomocą wiązania kowalencyjnego jednej lub większej liczby reszt winka przy wolnych grupach aminowych cząsteczki immunoglobuliny, na przykład grup aminowych pochodzących od reszt lizynowych. Liczba reszt przyłączonych będzie zależała od stężenia składników reakcji i od czasu trwania reakcji, ale przeciętnie wynosi od 1, zwykle od 2 do 5.

Proces ten prowadzi się np. w ten sposób, że roztwór azydku w odpowiednim rozpuszczalniku, takim jak dioksan, wkrapla się powoli do buforowanego roztworu immunoglobuliny np. w boranowym roztworze buforowym 0,34 M przy wartości pH 9. Produkt sprzęgania wyodrębnia się przez odsączenie żelu i przechowuje w nasyconym roztworze siarczanu amonowego, przy czym można go ponownie z powrotem przeprowadzać łatwo do roztworu podając dializę za pomocą boranowego roztworu buforowego, albo też można go przechowywać w chłodni w temperaturze 4°C albo po zamrożeniu np. w temperaturze -20°C.

Azydkowy składnik reakcji o wzorze 3 można łatwo wytwarzać z winblastyny, siarczanu winblastyny lub dezacetylowinblastyny, korzystnie przez hydrazynolizę estru C³ i następnie dwuazowanie, np. sposobem opisanym w J. Med. Chem., 1978, tom 21, nr 1, strony 88-96 albo we wspomnianym wyżej brytyjskim opisie patentowym nr 1 463 575. Hydrazynoliza winblastyny przebiega korzystnie w umiarkowanych temperaturach w roztworze w metanolu i otrzymuje się monohydrazyd. Produkt ten poddaje się w temperaturze

0°C - 10°C reakcji z kwasem solnym i azotynem sodowym w odpowiednim rozpuszczalniku wodnym i otrzymuje żądany azydek kwasu dezacetylowinblastynowego.

Azydek o wzorze 3 można też wytwarzać w temperaturze poniżej 5°C, jak opisano wyżej i bez wyosobniania azydku można doprowadzać wartość pH mieszaniny do 9 oraz dodawać mieszający się z wodą rozpuszczalnik, taki jak np. dioksan. Następnie dodaje się immunoglobulinę w boranowym roztworze buforowym o wartości pH 9 i pozwala się na ogrzanie się mieszaniny do temperatury pokojowej. Nadmiar azydku niszczy się rozcieńczonym amoniakiem i produkt sprzęgania oczyszcza przez odsączenie żelu.

Ocenę produktu sprzęgania można dokonywać stosując znane metody, takie jak metoda powinowactwa chromatograficznego. Skuteczność sprzężonego produktu można oceniać określając liczbę komórek zdolnych do życia po potraktowaniu zawiesiny komórek nowotworu tym produktem albo mierząc pobór trytowanej urydyny. Stężenia proteiny i leku oznacza się przez pomiar gęstości optycznych roztworów produktu sprzężonego przy dwóch długościach fal, na przykład 270 i 280 i odniesienie otrzymanych wartości do wartości wolnego leku i niesprężonej immunoglobuliny przy tych samych długościach fal.

Nowe produkty sprzęgania wytworzone sposobem według wynalazku są użyteczne przy zwalczaniu raka i w tym celu przygotowuje się je korzystnie w postaci preparatów do wstrzykiwania lub preparatów farmaceutycznych zawierających produkt sprzęgania razem z farmakologicznie dopuszczalnym nośnikiem lub rozcieńczalnikiem. Korzystnie stanowią one dawkę jednostkową, zawierającą np. od 0,01 do 2 mg czarnej substancji /określenie to dotyczy grupy windezynowej/.

Nowe produkty sprzęgania są skuteczne w szerokim zakresie ich dawek i np. przy leczeniu ludzi dorosłych dawka tygodniowa wynosi zwykle 1-10 mg/kg /w przeliczeniu na grupę windezyny/, a przeważnie 5-9 mg/kg. Jednakże ilość związku podawanego jest określana przez lekarza w zależności od danych okoliczności, w tym też stanu pacjenta i wybranej drogi podawania leku.

Wynalazek zilustrowano w następujących przykładach.

P r z y k ł a d I. Wytwarzanie produktu sprzęgania windezyny z owczym antygenem przeciw zarodkom raka. 6 mg hydrazynu kwasu dezacetylowinblastynowego rozpuszczono w 340 μ l 1n HCl i chłodzono roztwór do temperatury 4°C, po czym dodano 60 μ l wodnego roztworu azotynu sodowego o stężeniu 10 mg/ml i mieszano w temperaturze 4°C. Po upływie 5 minut silnie mieszając, dodano 300 μ l 1n NaOH i 120 μ l dioksanu, a następnie 280 μ l roztworu owczego anty-CEA o stężeniu 21,3 mg/ml w boranowym roztworze buforowym mającym stężenie 0,34 M i wartość pH 8,6. Mieszaninę mieszano w pokojowej temperaturze w ciągu 2 godzin, utrzymując wartość pH 9 za pomocą 0,1 n NaOH. Nadmiar azydku rozłożono dodając 60 μ l 1n NH_4OH i mieszając dalej w ciągu 1 godziny. Produkt wyosobniono drogą filtracji żelu na kolumnie Bio-Gel® P-6 o wymiarach 1 x 25,5 cm /20 ml/, zrównoważonej solanką buforowaną fosforanem. Otrzymano 2,66 ml frakcji szczytowej i zawartość proteiny określono metodą Lowry, a windezynę oznaczono metodą spektroskopii różnicowej. Wytworzony w ten sposób produkt sprzęgania zawierał 4,6 mola windezyny na 1 mol Ig.

P r z y k ł a d II. Wytwarzanie produktu sprzęgania windezyny z mysim monoklonicznym antygenem przeciw zarodkom raka. 10 mg hydrazynu kwasu dezacetylowinblastynowego rozpuszczono w 0,56 ml 1n HCl i ochłodzono roztwór do 4°C. Dodano 100 μ l roztworu azotynu sodu o stężeniu 10 mg/ml i mieszano w temperaturze 4°C. Po 5 minutach, przy energicznym mieszaniu dodano 0,5 ml 1n NaOH i 0,2 ml dioksanu, a następnie 0,5 ml roztworu mysiego monoklonicznego anty-CEA o stężeniu 15,6 mg/ml w boranowym roztworze buforowym mającym stężenie 0,34 M i wartość pH 8,6. Mieszaninę mieszano w temperaturze pokojowej przez 2 godziny utrzymując pH na poziomie 9 za pomocą 0,1 n NaOH. Nadmiar azydku rozłożono dodając 0,1 ml 1n NH_4OH i mieszając przez dalszą godzinę. Produkt wyosobniono drogą filtracji żelu na kolumnie Bio-Gel® P-6 o wymiarach 1 x 27 cm /21 ml/ zrównoważonej solanką buforowaną fosforanem. Otrzymano 4,07 ml frakcji szczytowej i zawartość

proteiny i windezyny oznaczono metodą spektroskopii przy 270 i 280 nm. Wytworzony w ten sposób produkt sprzęgania zawierał 2,1 mola windezyny na mol Ig.

P r z y k ł a d I I I. Wytwarzanie produktu sprzęgania windezyny z króliczą przeciwmysią Ig. 12 mg hydrazynu kwasu dezacetylowinblastynowego, rozpuszczono w 0,67 ml 1n HCl i roztwór ten ochłodzono do 4°C. Dodano 120 µl roztworu azotynu sodu o stężeniu 10 mg/ml i mieszano w temperaturze 4°C. Po 5 minutach energicznie mieszając dodano 0,6 ml 1n NaOH i 0,24 ml dioksanu, a następnie 1,0 ml roztworu króliczej przeciwmysiej Ig o stężeniu 11,7 mg/ml w boranowym roztworze buforowym mającym stężenie 0,34 M i wartość pH 8,6. Mieszaninę mieszano w temperaturze pokojowej przez 2 godziny utrzymując pH na poziomie 9 za pomocą 0,1 n NaOH. Nadmiar azydku rozłożono dodając 0,12 ml 1n H₄OH i mieszając przez dalszą godzinę. Produkt wyosobniono drogą filtracji żelu na kolumnie Bio-Gel® P-6 o wymiarach 1,5 x 26 cm /46 ml/ zrównoważonej solanką buforowaną fosforanem. Otrzymano 6,22 ml frakcji szczytowej i zawartość proteiny i windezyny oznaczono metodą spektroskopii przy 270 i 280 nm. Wytworzony w ten sposób produkt sprzęgania zawierał 3,2 mola windezyny na mol Ig.

P r z y k ł a d I V. W gniazdach tacy do mikromiareczkowania kultur wytworzono zawiesinę preparatu z hodowli rosnących komórek, przy stężeniu komórek 10⁴ na gniazdo. Po pozostawieniu komórek na 24 godziny dla przyjęcia się hodowli, replikowane gniazda traktowano szeregiem różnych stężeń produktu sprzęgania lub preparatem kontrolnym. Po 6-dniowym prowadzeniu hodowli szacowano ilość komórek obecnych w gniazdach przez obliczanie bezpośrednie za pomocą analizatora obrazu mikroskopu inwersyjnego. W jednym przykładzie komórkę gruczolaka odbytnicy ludzkiej traktowano windezyną połączoną z przeciwciałem monoklonicznego antygenu przeciw zarodkom raka w stosunku molowym 2,1 mola windezyny na mol Ig stosuje produkt sprzęgania z przykładu II i oznaczono działanie cytostyczne poprzez liczenie komórek jak następuje:

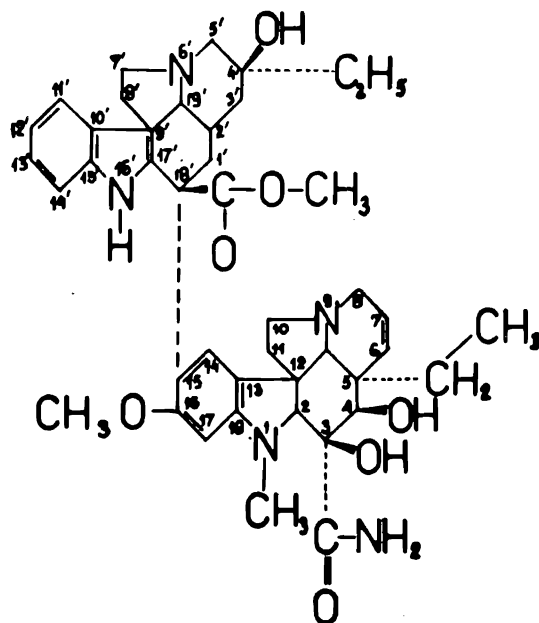
Stężenie sprzężonego leku z windezyną mg/l	Ilość komórek /gniazdo po 6 dniach/ ± przeciętne odchylenie od normy 4 repliki	% w stosunku do próby kontrolnej
0	1,63 ± 4,8 x 10 ⁴	100
0,08	13,8 ± 2,5 x 10 ⁴	84,6
0,40	12,6 ± 1,9 x 10 ⁴	77,4
2,00	10,8 ± 3,9 x 10 ⁴	66,7
10,00	1,9 ± 0,6 x 10 ⁴	11,9

Z a s t r z e ż e n i a p a t e n t o w e

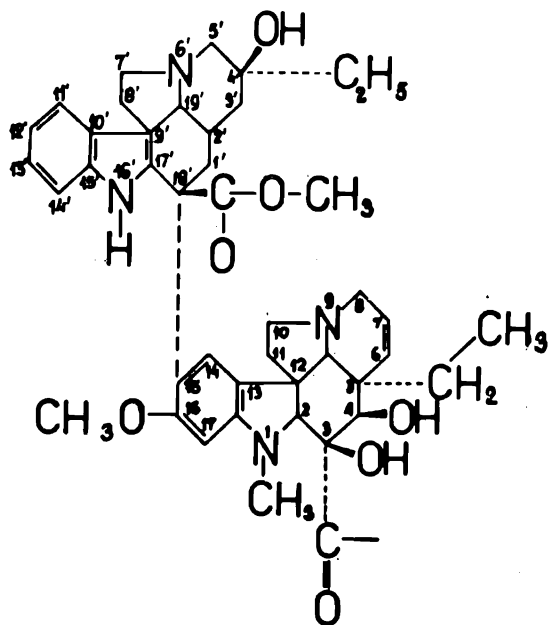
1. Sposób wytwarzania produktu sprzęgania zawierającego immunoglobulinę lub fragment immunoglobuliny zmodyfikowane przez jedną lub większą liczbę grup o wzorze 2 związanych z nimi kowalencyjnie, z n a m i e n n y t y m, że poddaje się reakcji immunoglobulinę lub fragment immunoglobuliny z azydkiem kwasu dezacetylowinblastynowego o wzorze 3.

2. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że sprzęganiu poddaje się IgG immunoglobulinę.

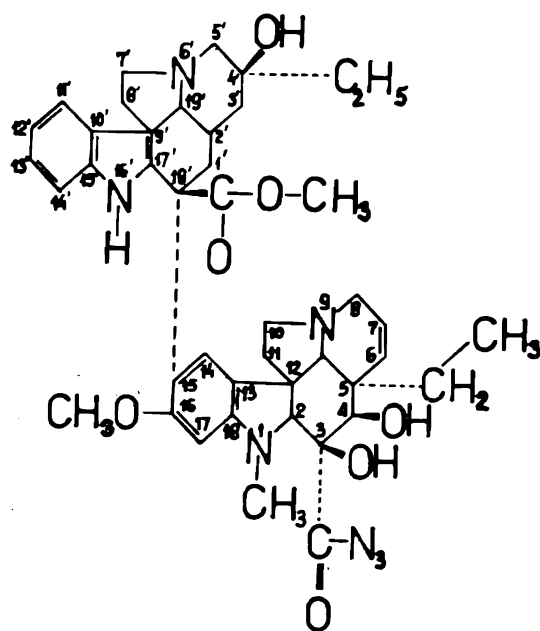
3. Sposób według zastrz. 1 albo 2, z n a m i e n n y t y m, że immunoglobulinę lub jej fragment modyfikuje się średnio za pomocą 2-5 grup o wzorze 2.



wzór 1



wzór 2



wzór 3